

München, 1960

Über die Wirkung
von Phenyläthylbiguanid (DBI) auf den
Fettstoffwechsel der Leber

von

ERHARD R. MAHRHOFER

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof.Dr.med.W.Seitz

ÜBER DIE WIRKUNG VON PHENYLÄTHYLBIGUANID (DBI)
AUF DEN FETTSTOFFWECHSEL DER LEBER

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt

von

Erhard R. Mahrhofer
aus Schaffa

München 1960

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. H. Eyer

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.1960

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	4
Methodik	6
Ergebnisse	10
Diskussion	19
Zusammenfassung	23
Literaturverzeichnis	24
Lebenslauf	28



E i n l e i t u n g

Von Ungar und Mitarbeitern (1) wurde 1957 ein Biguanid, das sogenannte DBI (=Phenyläthylbiguanid), entwickelt und von Pomeranze (2) und Krall (3) für die Diabetestherapie klinisch erprobt.

Über den Wirkungsmechanismus des DBI besteht noch nicht völlige Klarheit. Ungar (1) zeigte an Tieren, deren Inselzellen durch Alloxan ausgeschaltet waren, daß das DBI unabhängig von einem funktionstüchtigen Inselzellapparat blutzuckersenkend wirkt. Ungar stellte keine wesentliche Änderung des Glykogengehaltes der Leber unter DBI-Wirkung fest. Dagegen fanden andere Autoren (4) (5) eine Verarmung der Leber an Glykogen unter DBI. Außerdem bewirkt das DBI eine Senkung der O_2 -Aufnahme (5) und einen Anstieg der Milchsäure (6).

Creutzfeldt (4) wies auf eine Ähnlichkeit im Wirkungsmechanismus des DBI und des Synthalins hin. Das durch Frank, Nothmann und Wagner (7) (8) zur Behandlung des Diabetes mellitus eingeführte Synthalin ist dem DBI auch chemisch nahestehend (9) und zeigt ähnliche gastrointestinale Nebenerscheinungen wie das DBI (10). Das Synthalin hat sich jedoch im Tierexperiment (11) und in der Klinik (12) (13) als lebertoxisch erwiesen, und es lag der Verdacht nahe, daß auch die Biguanide gewisse lebertoxische Eigenschaften haben könnten.

Da das DBI von allen Biguaniden bei gleicher Dosis sowohl die stärkste blutzuckersenkende Wirkung, als auch die stärksten gastrointestinalen Nebenerscheinungen hat (14), würden bei Verabreichung dieses Biguanids Leberschäden am deutlichsten auftreten, wenn die Biguanide lebertoxisch sein sollten.

Eine Leberschädigung macht sich im allgemeinen als Leberverfettung bemerkbar, wobei der Fettstoffwechsel der Leber gesteigert sein muß.

Wegen der Befürchtung einer Leberverfettung, vor allem aber wegen des nicht völlig geklärten Wirkungsmechanismus ist die Wirkung des DBI auf den Fettstoffwechsel der Leber von besonderem Interesse.

Nachdem Rittenberg und Bloch (15) zeigten, daß verfütterte C^{14} -markierte Essigsäure in die Fettsäuren eingebaut wird, wurde über den Fettstoffwechsel mit C^{14} -markierten Acetat mehrfach gearbeitet.

1956 zeigten von Brand und Helmreich (16) die Abhängigkeit der Lipogenese von der Glykolyse an der Taubenleber, von Brand (17) und Kolitz (18) wiesen auf Unterschiede der Fettsynthese und der CO_2 -Ausscheidung bei normal ernährten und hungernden Tauben hin. Bloch konnte mit Hilfe der Isotopentechnik feststellen, daß sämtlich 27 Kohlenstoffatome des Cholesterins aus der Essigsäure stammen (19) (20).

Es soll in dieser Arbeit mit Hilfe C^{14} -markierten Acetat untersucht werden, welchen Einfluß das DBI auf den Fettstoffwechsel der Taubenleber in vivo hat, insbesondere ob das DBI eine Steigerung der Fettsynthese bewirkt. Dabei wurde der Einbau von C^{14} -Acetat in die Gesamtfette, Neutralfette, Phosphatide und in das Cholesterin der Leber gemessen und der Anteil an $C^{14}O_2$ in der Ausatemungsluft bestimmt.

M e t h o d i k

Für die Versuche werden junge Tauben (6 - 12 Monate alt) für eine längere Zeit im Stall reichlich mit Weizen ernährt. Einige dieser Tauben werden ohne Vorbehandlung für die Versuche verwendet. Diese Tiere werden als Normaltauben bezeichnet. Ein anderer Teil der Tauben erhält eine Stunde vor Versuchsbeginn 30 mg DBI - Reinsubstanz in ca. 2 - 3 ml H_2O gelöst in den Kropf instilliert. Diese Tiere werden DBI - Tauben Gruppe I genannt. Außerdem werden bei anderen Tauben 3 bis 4 Tage lang vor Versuchsbeginn täglich 10 mg bzw. 30 mg DBI in 2 - 3 ml H_2O gelöst instilliert. Diese Tiere werden DBI - Tauben Gruppe II bzw. Gruppe III bezeichnet.

Der für den Versuch bestimmten Taube wird 1 ml einer 0,008 m 1 - C^{14} -Na-Acetatlösung mit einer Radioaktivität von ca.

$3,0 \cdot 10^5$ Imp/min mit der gleichen Menge Wasser vermischt in den Kropf instilliert. Darauf wird die Taube sofort in den Stoffwechselkäfig, einem Exsiccator von ca. 3 l Inhalt, gebracht. Durch eine Wasserstrahlpumpe wird ein möglichst konstanter Luftdurchfluß durch den Stoffwechselkäfig erzeugt.

Das CO_2 der angesaugten Frischluft wird durch vorgeschaltete NaOH gebunden. Die abgesaugte Ausatemungsluft wird über zwei mit 20%iger NaOH gefüllte Absorptionsgefäße durch zwei Absorptionsfritten geleitet. Dadurch wird das gesamte CO_2 der Ausatemungsluft absorbiert.

Die ausgeatmete CO_2 wird nach 15, 30, 60, 120 und 150 Minuten, von Beginn des Versuches an gerechnet, in getrennten Portionen aufgefangen. In den einzelnen Portionen wird das CO_2 als $BaCO_3$ bestimmt: Nach Zugabe von 10 ml 25%igem Ammoniumchlorid wird die Lösung zum Sieden erhitzt. Unter Umrühren wird tropfenweise heißes Bariumchlorid zugegeben. Die Kohlensäure fällt als

BaCO_3 aus. Das BaCO_3 wird in einem Filtertiegel (G 4) aufgefangen. Die Tiegel werden bei 105° im Trockenschrank 12 Stunden lang bis zur Gewichtskonstanz erwärmt und verbleiben anschließend 1/2 Stunde im Exsiccator. Das Gesamtgewicht an BaCO_3 wird bestimmt. Ein Teil des BaCO_3 wird im Mörtel pulverisiert und mit Zaponlack (1% in absolutem Alkohol) verrieben. Eine möglichst dünne Schicht dieses Breies wird auf jeweils zwei Metallplättchen ($\varnothing$ 25 mm) aufgetragen. Die Plättchen werden unter Rotlicht getrocknet und das Gewicht der aufgegossenen Menge BaCO_3 festgestellt. (Das Gewicht des Zaponlacks kann vernachlässigt werden). Die Belegung der Plättchen soll $5 \text{ mg BaCO}_3/\text{cm}^2$ nicht überschreiten, da sonst die Selbstabsorption zu groß wird. Die Aktivität des $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$ auf dem Plättchen wird vier Minuten im Geigerzähler gemessen. Die Gesamtaktivität des $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$ auf den Plättchen wird unter Berücksichtigung der Selbstabsorption nach den Richtlinien, die in "Isotopic Carbon" (21) angegeben sind, errechnet. Anschließend erfolgt die Umrechnung auf die in den einzelnen Portionen insgesamt ausgeschiedenen Menge aktiven Carbonates.

Nach Beendigung des Atmungsversuches wird die Taube getötet und die Leber entnommen. Bindegewebe und Blutkoagula werden von der Leber entfernt, die Leber wird abgetrocknet und gewogen. Dann wird sie mit dem äquivalenten Gewicht an Aqua dest. versetzt und bei 12 000 Umdrehungen/min. 2 Minuten lang im Homogenisator (Homogenisator für wissenschaftliche Zwecke der Fa.E.Bühler, Tübingen) homogenisiert. 10 g des Homogenates, die 5 g Leber entsprechen, werden in einem Rundkolben von 1 l Volumen mit 500 ml Bloor'scher Lösung (1 Teil Äther, 3 Teile 96%iger Alkohol) versetzt. Diese Lösung wird bei 70° im Wasserbad eine Stunde lang am Rückflußkühler gekocht, um die Fette

zu extrahieren. Danach wird der Überstand durch ein Filter abdekantiert und der Rückstand mit etwa 200 ml Chloroform und 40 ml Methanol noch eine halbe Stunde bei 70° im Wasserbad am Rückflußkühler gekocht, um Fettreste im Rückstand zu extrahieren. Das gesamte Gemisch wird durch das schon benutzte Filter gegeben und der Rückstand mit Chloroform nachgewaschen. Die so erhaltene Lösung wird im Wasserbad bei 50° im Vacuum bis zur Trockne eingedampft, nochmals mit 20 ml absolutem Alkohol versetzt, um alles Wasser zu entfernen, und zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird mit Petroläther filtriert und auf 25 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung, die das Gesamtfett enthält, werden 1 ml auf ein Aluminiumschälchen von 30 mm Durchmesser und 3 mm Randhöhe gegossen, das mit einem Blättchen aus Lenspaper "Josta-Klar" mit Siliconöl der Fa. Josta G.m.b.H., München, belegt ist. Nachdem der Petroläther an der Luft verdampft ist, wird das Schälchen im Methandurchflußzähler gemessen. Von der 25 ml-Lösung werden 4 ml zur Cholesterinbestimmung und 16 ml zur Auftrennung in eine acetonlösliche und eine acetonunlösliche Fraktion weiterverarbeitet. Zur Auftrennung werden die 16 ml Lösung fast bis zur Trockene eingedampft und auf 0° gekühlt. Unter ständigem Rühren werden etwa 30 ml eisgekühltes Aceton zugegeben. Zur vollständigen Fällung wird das Gemisch bei 0° mindestens 12 Stunden stehen gelassen. Die überstehende Acetonlösung wird abpipettiert und filtriert. Der Rückstand wird nochmals mit etwa 15 ml Aceton versetzt und der dabei entstehende Überstand abfiltriert. Die vereinigten Acetonlösungen werden eingedampft und mit Petroläther gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. Diese 10 ml enthalten die acetonlösliche Fraktion, die zum größten Teil aus Neutralfetten besteht. Der Rückstand,

der vornehmlich die Phosphatide enthält, wird ebenfalls mit Petroläther gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. Von den beiden Lösungen werden wie bei den Gesamtfetten jeweils Plättchen mit 1 ml gegossen und im Methandurchflußzähler gemessen.

Die Umrechnung der Aktivität auf die Gesamtmenge von 25 ml erfolgt nach der Formel $\frac{\text{Imp.} \cdot 10 \cdot 25}{16}$.

Zur Cholesterinbestimmung werden 4 ml von der 25 ml-Lösung der Gesamtfette im Wasserbad bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 4 ml Bloor'scher Lösung gelöst. Diese Lösung wird gegen Phenolphthalein mit 2 n KOH ausreichend alkalisch gemacht und im Wasserbad etwa 1 Stunde lang bei 37° verseift. Zur Verringerung der Selbstabsorption wurde im Gegensatz zu Hinkelman u.a. (22) um die Plättchenbeschickung möglichst dünn zu halten, kein inaktives Cholesterin dazugegeben. Zur Reindarstellung des Cholesterins wird nun eine Digitoninfällung vorgenommen mit einer 1%igen Digitoninlösung in 50%igem Alkohol. Es entsteht ein unlösliches Cholesterindigitonid. Die Fällung wird über Nacht stehen gelassen und danach der entstandene Niederschlag in einer Filtervorrichtung für radioaktive Niederschläge (Fa.Schott Gen) auf Filterpapierplättchen filtriert. Um alle Reste von Fett und anderen unspezifischen Substanzen zu entfernen wird mit einer Aceton-Äthermischung (1:1) nachgewaschen und die Plättchen im Exsiccator getrocknet. Die Messung erfolgt im Methan-Durchflußzähler.

E r g e b n i s s e

1.) Atmungsversuche:

Über die quantitative Ausscheidung an aktiven und inaktiven Kohlendioxyd, die als Bariumcarbonat in Gramm gemessen wurde, gibt Tabelle 1 Aufschluß. In den Schaubildern 1 - 4 ist die zeitliche Verteilung der Aktivitäten der $C^{14}O_2$ -Ausscheidung (in $\text{Imp.}10^4/\text{min.}$) aller 4 Versuchsgruppen dargestellt und zwar in jeweils 2 Kurven. Kurve I zeigt die Werte innerhalb der einzelnen Zeitabschnitte an. Kurve II ist die Summenkurve, d.h. die Einzelwerte werden addiert zur Darstellung gebracht. Die einzelnen Werte zu diesen Schaubildern sind in den Tabellen 2 und 3 aufgezeichnet.

2.) Leberaufarbeitung:

In den Tabellen 4,5 und 6 sind die Ergebnisse der Leberaufarbeitung enthalten. In Tabelle 4 findet man die einzelnen Lebergewichte, wobei immer nur 5 g Leber verarbeitet wurde. So sind auch die in Tabelle 4 enthaltenen Aktivitäten der Gesamtfette, Neutralfette und Phosphatide auf 5 g Leber umgerechnet (angegeben in $\text{Imp.}10^4/\text{min.}$) In der nächsten Spalte steht das Verhältnis Neutralfette zu Phosphatide. In Tabelle 5 sind die Werte der Tabelle 4 auf das Gewicht der Gesamtleber umgerechnet.

Tabelle 6 enthält die Werte der Aktivitäten des Cholesterin in $\text{Imp}/\text{min.}$, die Umrechnung auf das Gesamtcholesterin der 25 ml-Lösung (in $\text{Imp.}10^4/\text{min.}$) und die Umrechnung auf das gesamte Cholesterin der Leber.

Tabelle 1: Ausscheidung des gesamten BaCO_3 in Gramm in den einzelnen Zeitintervallen

Versuch Nr.:	15'	30'	60'	120'	150'	Summe:
Normaltauben						
5	1,65	1,48	3,12	3,12	2,57	
6	1,95	1,42	3,88	7,12	2,74	
7	3,10	2,79	4,08	6,54	3,73	
14	1,49	1,82	2,91	4,78	2,60	
17	0,86	1,58	3,50	4,83	2,77	
18	2,16	2,89	4,22	8,11	3,99	
20	<u>2,82</u>	<u>3,14</u>	<u>4,85</u>	<u>7,82</u>	<u>3,74</u>	
	2,00	2,14	3,79	6,04	3,16	17,13
DBI, Gruppe I						
1	0,93	1,29	2,37	245	-	
2	1,68	1,49	2,20	3,54	-	
3	1,28	3,25	3,01	5,00	2,81	
4	1,99	2,01	4,17	5,03	2,46	
8	1,13	1,13	2,38	3,85	2,24	
9	-	1,58	2,19	3,43	1,74	
10	<u>2,19</u>	<u>1,35</u>	<u>2,02</u>	<u>4,51</u>	<u>2,81</u>	
	1,53	1,72	2,62	3,97	2,41	12,25
DBI, Gruppe II						
19	3,03	2,37	3,18	5,30	2,61	
21	1,18	1,43	2,16	4,07	2,73	
22	1,00	1,23	1,98	3,46	0,58	
23	<u>1,16</u>	<u>1,54</u>	<u>2,42</u>	<u>4,13</u>	<u>2,87</u>	
	1,59	1,64	2,43	4,24	2,19	12,09
DBI, Gruppe III						
11	1,08	0,98	1,74	2,31	0,60	
12	2,14	1,13	1,39	3,22	2,53	
13	1,29	1,81	0,70	4,14	1,89	
15	0,86	1,07	3,51	2,71	7,04	
16	<u>1,60</u>	<u>1,42</u>	<u>3,12</u>	<u>5,45</u>	<u>3,07</u>	
	1,39	1,28	2,09	3,56	3,02	11,34

SCHAUBILD 1
NORMALTAUBEN

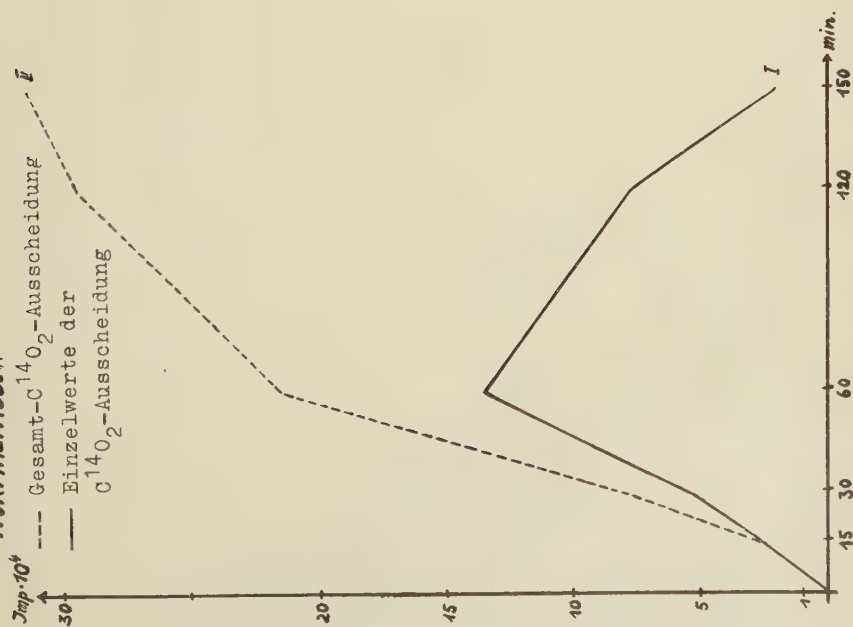


SCHAUBILD 2
DBJ-TAUBEN, GRUPPE I

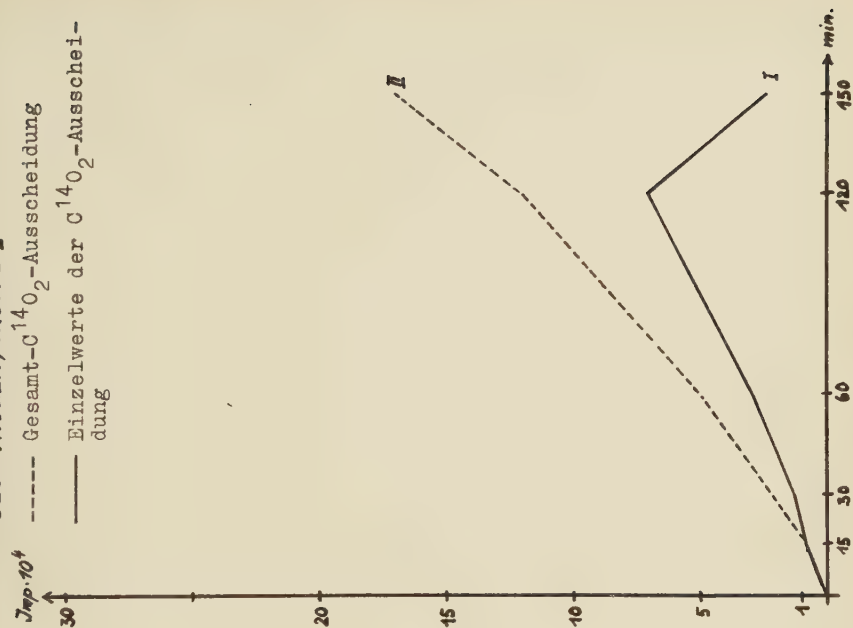


SCHAUBILD 3

DBJ-TAUBEN, GRUPPE II

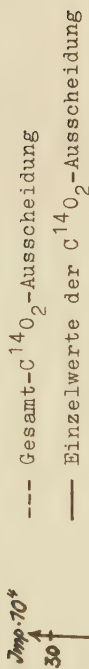


SCHAUBILD 4

DBJ-TAUBEN, GRUPPE III

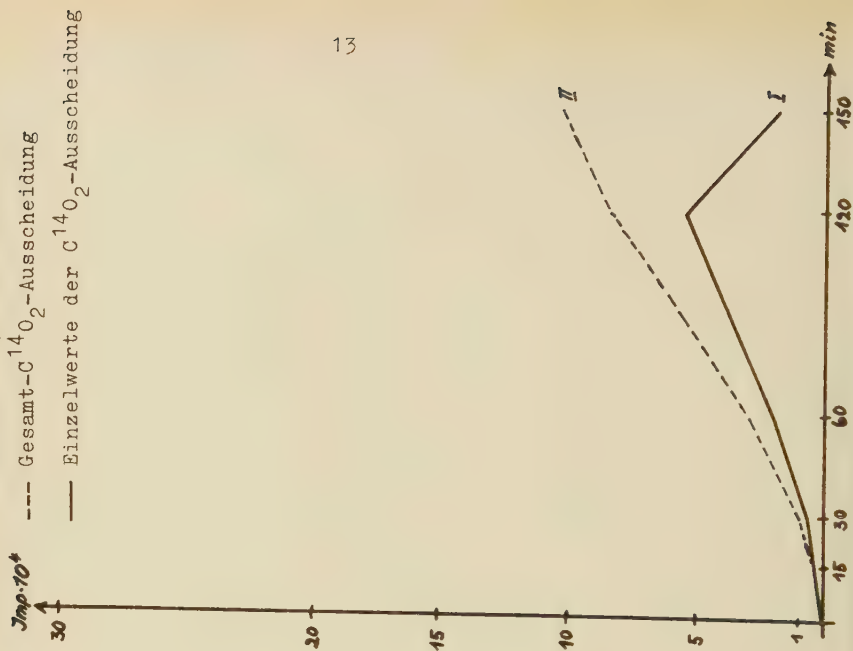


Tabelle 2: Gesamtaktivität der $C^{14}O_2$ -Ausscheidung
in $\text{Imp} \cdot 10^4 / \text{min.}$ in den einzelnen Zeitintervallen.

Versuch Nr.:	15'	30'	60'	120'	150'
Normaltauben:					
5	0,13	0,77	2,71	3,70	2,08
6	3,71	2,98	8,37	5,21	2,40
7	6,25	6,52	8,29	5,12	2,07
14	2,06	6,79	11,55	16,15	2,30
17	2,02	9,61	47,90	8,16	2,45
18	0,54	2,90	6,27	7,75	1,69
20	<u>3,95</u>	<u>7,38</u>	<u>10,40</u>	<u>8,79</u>	<u>1,80</u>
	2,66	5,27	13,64	7,84	2,11

DBI Tauben (Gruppe I)

1	0,12	0,20	0,43	1,17	-
2	1,32	1,47	3,86	6,65	-
3	0,84	0,29	1,44	5,51	1,89
4	1,46	2,72	6,22	5,85	1,43
8	0,27	0,29	1,62	8,02	3,80
9	-	3,08	2,99	7,90	1,59
10	<u>1,36</u>	<u>1,36</u>	<u>3,44</u>	<u>14,35</u>	<u>7,78</u>
	0,89	1,34	2,85	7,06	2,35

DBI Tauben (Gruppe II)

19	1,53	4,15	6,07	11,03	3,94
21	0,79	3,12	6,84	16,20	2,58
22	0,25	2,43	5,36	9,86	1,16
23	<u>0,08</u>	<u>1,42</u>	<u>5,96</u>	<u>5,48</u>	<u>0,50</u>
	0,66	2,78	6,05	10,64	2,04

DBI Tauben (Gruppe III)

11	0,22	1,25	5,40	16,75	3,75
12	0,38	0,82	2,59	3,19	0,28
13	0,56	0,53	0,18	2,16	1,83
15	0,04	0,14	0,14	1,38	0,63
16	<u>0,15</u>	<u>0,32</u>	<u>1,48</u>	<u>3,71</u>	<u>2,60</u>
	0,27	0,61	1,95	5,43	1,81

Tabelle 3: Gesamtaktivität der $C^{14}O_2$ - Ausscheidung
in Imp . 10^4 /min.

Versuch Nr.:	15'	30'	60'	120'	150'
Normaltauben					
5	0,13	0,95	3,65	7,34	9,45
6	3,71	6,69	15,06	20,27	22,67
7	6,25	12,77	21,06	26,18	28,25
14	2,06	8,85	20,40	36,55	38,85
17	2,02	11,82	59,75	67,58	20,20
18	0,54	3,44	9,72	17,52	19,11
20	<u>3,95</u>	<u>11,33</u>	<u>21,73</u>	<u>30,53</u>	<u>32,34</u>
	2,66	7,97	21,62	29,49	31,55

DBI - Tauben (Gruppe I)

1	0,12	0,32	0,75	1,92	-
2	1,32	2,79	6,65	13,30	-
3	0,84	1,13	2,59	8,01	9,90
4	1,46	4,18	10,40	16,25	17,68
8	0,27	0,56	2,18	10,20	13,20
9	-	3,08	6,07	13,97	15,56
10	<u>1,36</u>	<u>2,72</u>	<u>6,15</u>	<u>20,50</u>	<u>28,30</u>
	0,89	2,11	4,97	12,02	16,92

DBI - Tauben (Gruppe II)

19	1,53	5,68	13,75	24,78	28,73
21	0,79	3,91	10,75	26,95	29,54
22	0,25	2,68	8,02	17,88	19,00
23	<u>0,08</u>	<u>1,50</u>	<u>7,46</u>	<u>12,94</u>	<u>13,44</u>
	0,66	3,44	9,99	20,63	22,67

DBI - Tauben (Gruppe III)

11	0,38	1,21	3,80	6,99	7,28
12	0,56	1,09	1,29	3,44	5,48
13	0,04	0,19	0,33	1,71	2,34
15	0,15	0,48	1,96	5,68	8,50
	<u>0,22</u>	<u>1,47</u>	<u>6,87</u>	<u>23,55</u>	<u>27,40</u>
	0,27	0,88	2,85	8,27	10,20

Tabelle 4: Leberaufarbeitung

Vers.Nr.	Lebergewicht in Gramm	Gesamt-fette in Imp.10 ⁴ /min.	Neutral- fette in Imp.10 ⁴ /min.	Phospha- tide in Imp.10 ⁴ /min.	N:P
----------	--------------------------	--	---	--	-----

für 5 g Leber

Normaltauben

5	9,5	5,18	1,94	2,25	1:1,18
6	8,5	11,64	4,61	2,89	1:0,52
7	12,2	12,78	9,00	4,20	1:0,47
14	7,5	8,20	3,35	4,58	1:1,37
17	6,2	16,18	8,91	9,06	1:1,01
18	7,7	11,95	5,41	6,12	1:1,13
20	<u>10,5</u>	<u>6,68</u>	<u>3,05</u>	<u>3,44</u>	<u>1:1,12</u>
	8,8	10,37	5,18	4,65	1:0,95

DBI-Tauben (Gruppe I)

1	6,2	0,86	0,34	0,27	1:0,79
2	8,0	2,57	1,43	1,47	1:1,03
3	14,1	1,64	1,00	0,90	1:0,89
4	12,2	2,70	1,21	1,08	1:0,90
9	5,0	2,41	0,88	1,94	1:2,20
10	<u>7,7</u>	<u>7,01</u>	<u>4,18</u>	<u>4,50</u>	<u>1:1,07</u>
	8,8	2,86	1,50	1,69	1:1,14

DBI-Tauben (Gruppe II)

19	6,1	1,86	0,56	0,62	1:1,10
21	12,0	3,74	1,10	1,69	1:1,53
22	<u>9,0</u>	<u>4,79</u>	<u>1,30</u>	<u>3,17</u>	<u>1:2,42</u>
	9,0	3,46	0,98	1,82	1:1,68

DBI-Tauben (Gruppe III)

11	9,2	1,63	0,75	1,45	1:1,91
12	8,5	0,92	0,46	0,68	1:1,43
13	7,5	0,64	0,27	0,32	1:1,19
15	10,7	3,06	1,11	1,60	1:1,43
16	<u>12,5</u>	<u>2,92</u>	<u>1,38</u>	<u>1,52</u>	<u>1:1,10</u>
	9,78	1,83	0,79	1,11	1:1,41

Tabelle 5: Leberaufarbeitung

Versuch Nr.	Gesamtfette in Imp.10 ⁴ /min.	Neutralfette in Imp.10 ⁴ /min	Phosphatide in Imp.10 ⁴ /min
Normaltauben für die gesamte Leber			
5	9,84	3,69	4,28
6	19,79	7,84	4,91
7	31,18	21,96	10,24
14	12,30	5,02	6,88
18	20,07	11,05	11,23
20	18,40	8,33	9,42
	<u>14,02</u>	<u>6,42</u>	<u>7,23</u>
	17,94	9,18	7,74
DBI-Tauben (Gruppe I)			
1	1,07	0,42	0,33
2	4,11	2,30	2,36
3	4,64	2,84	2,54
4	6,59	2,95	2,65
9	2,41	0,88	1,94
10	<u>10,79</u>	<u>6,45</u>	<u>6,93</u>
	4,93	2,64	2,79
DBI-Tauben (Gruppe II)			
19	2,27	0,68	0,76
21	8,98	2,64	4,06
22	8,62	2,35	5,70
23	<u>9,06</u>	<u>4,01</u>	<u>9,37</u>
	7,23	2,42	4,97
DBI-Tauben (Gruppe III)			
11	3,01	1,39	2,65
12	1,56	0,81	1,16
13	0,97	0,41	0,49
15	6,55	2,39	3,42
16	<u>7,30</u>	<u>3,45</u>	<u>3,80</u>
	3,87	1,69	2,30

Tabelle 6: Cholesterinbestimmung

Versuch Nr.	Imp/min. von 4 ml der Gesamt- lösung	Gesamtcho- lesterin (der 25 ml- Lösung) in Imp.10 ⁴ /min.	Cholesterin (von 1 g Le- ber) in Imp.10 ⁴ /min.	Cholesterin (der Gesamt- leber) in Imp.10 ⁴ /min.
Normaltauben				
5	131	0,08	164	0,15
6	530	0,33	662	0,56
7	762	0,47	950	1,15
14	1476	0,92	1835	1,37
18	1186	0,74	1480	1,13
20	<u>263</u>	<u>0,16</u>	<u>330</u>	<u>0,35</u>
	724	0,45	903	0,78
DBI-Tauben (Gruppe I)				
4	288	0,18	360	0,44
8	443	0,27	552	0,39
9	315	0,19	395	0,19
10	<u>950</u>	<u>0,59</u>	<u>1180</u>	<u>0,91</u>
	499	0,30	621	0,48
DBI-Tauben (Gruppe II)				
19	843	0,52	1060	0,64
21	442	0,27	552	0,66
22	<u>777</u>	<u>0,48</u>	<u>970</u>	<u>0,87</u>
	687	0,42	860	0,72
DBI-Tauben (Gruppe III)				
11	256	0,16	320	0,29
12	231	0,14	288	0,24
13	150	0,09	188	0,14
15	933	0,58	1170	1,25
16	<u>677</u>	<u>0,42</u>	<u>8,45</u>	<u>1,02</u>
	449	0,27	562	0,58

D i s k u s s i o n

Bei der Auswertung der Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß schon unter den selben Versuchsbedingungen die Werte einer großen physiologisch bedingten Schwankung unterliegen. Dabei können sich einzelne Werte verschiedener Versuchsgruppen überschneiden.

Trotzdem unterscheiden sich die Normaltauben von allen DBI-Taubengruppen wesentlich in der Gesamtmenge des aktiven Carbonats. Der Durchschnittswert der Gesamt-BaC¹⁴O₂-Ausscheidung der Normaltauben liegt über $31 \cdot 10^4$ Imp/min Gesamtaktivität. Dagegen bewirkt schon die dreimalige DBI-Dosis von 10 mg (Gruppe II), die sich bei fast allen Untersuchungen als am schwächsten wirksam erwies, mit einem Durchschnittswert von $22,67 \cdot 10^4$ Imp/min eine geringere Ausscheidung als die der Normaltauben. Es folgt die Gruppe I mit einem Durchschnitt von $16 \cdot 10^4$ Imp/min. Den stärksten Effekt findet man bei Gruppe III mit einer Verringerung der Gesamtaktivität des Carbonats auf $10,20 \cdot 10^4$ Imp/min gegenüber der Norm.

Um einen Einblick zu gewinnen, ob die gesamte CO₂-Ausscheidung durch DBI verringert ist, oder ob nur weniger C¹⁴O₂ gebildet wird, wurden in Tabelle 1 die Gesamtcarbonatmengen in g (aktives und inaktives Carbonat) aufgestellt. Auch hier zeigen die Normaltauben die höchste Ausscheidung. Alle DBI-Tauben haben eine geringere Ausscheidung und zwar wieder in der oben angeführten Reihenfolge der Versuchsgruppen. Dabei ist auffallend, daß der Anteil an aktivem Carbonat bei geringerer CO₂-Ausscheidung (also bei den DBI-Tauben) größer wird, d.h. die Gesamt-CO₂-ausatmung nimmt durch DBI nicht so rasch ab wie die Ausatmung des C¹⁴O₂.

Die einzelnen Versuchsgruppen unterscheiden sich auch in der quantitativen Verteilung der $C^{14}O_2$ -Ausscheidung innerhalb der einzelnen Zeitabschnitte (wie die Kurven I der Schaubilder 1 - 4 zeigen). Während die Normaltauben das Maximum der Ausscheidung mehr um die 60. Minute des Versuchs haben, ist das Maximum sämtlicher DBI-Taubengruppen zur 120. Minute hin verlagert. Die $C^{14}O_2$ -Ausscheidung ist durch DBI also nicht nur verringert sondern tritt auch verzögert ein.

Diese Hemmung der Atmung könnte folgendermaßen erklärt werden: Es wurde unter DBI - Wirkung eine Anreicherung an Metaboliten, wie Milchsäure und Brenztraubensäure, gefunden, die für eine gesteigerte anaerobe Glykolyse spricht (5) (23). Die anaerobe Glykolyse führt zu keiner CO_2 -Ausscheidung. Eine Steigerung der anaeroben Glykolyse auf Kosten der Atmung könnte die verringerte CO_2 -Ausscheidung erklären.

Steiner und Williams (23) führten die durch Biguanide, darunter DBI, und Synthalin verursachte Einschränkung der Atmung auf eine Hemmung der Cytochrom-c-Oxydation durch die Cytochromoxydase zurück.

Bei der Aufarbeitung der Leberfette zeigten sich ebenfalls charakteristische Unterschiede zwischen Normaltauben und DBI-Tauben. Die durchschnittliche Aktivität der Gesamtfette ist bei den DBI-Tauben der Gruppe III auf 21% der Werte der Normaltauben verringert. Die beiden anderen DBI-Taubengruppen liegen in derselben Reihenfolge wie bei den Atmungsversuchen zwischen den Normaltauben und den DBI-Tauben Gruppe III. Bei der Auftrennung der Gesamtfette in Neutralfette (N) und Phosphatide (P) muß das Verhältnis N : P berücksichtigt werden.

Die Durchschnittswerte seien hier nochmals angeführt:

Normaltauben		: N : P = 1 : 0,97
DBI Gruppe I		: N : P = 1 : 1,12
Gruppe II		: N : P = 1 : 1,84
Gruppe III		: N : P = 1 : 1,41

Hier zeigen sich zwar bei den Durchschnittswerten Unterschiede zwischen Normal- und DBI-Tauben, doch besteht bei den Einzelwerten eine sehr große Streubreite.

Vor allem zwischen den Einzelwerten der Normaltauben und Gruppe I treten Überschneidungen auf, so daß man nicht von einem charakteristischen Unterschied sprechen kann. Nur bei den Langversuchen (Gruppe II und III) ist eine Aktivität der Phosphatide konstant größer als die der Neutralfette. Man kann somit ein leichtes Überwiegen des Acetateinbaus in die Phosphatidfraktion unter DBI-Wirkung annehmen.

Tyberghein und Williams (24) fanden bei Meerschweinchen, die mit DBI behandelt waren, eine Abnahme der Gesamtfette in der Leber um 37%. Sie glauben damit die Möglichkeit ausschließen zu können, daß das DBI durch eine Umwandlung der Kohlehydrate in Fett blutzuckersenkend wirkt.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Versuchen, bei denen der Einbau C¹⁴-Acetat in die Fette eines Taubenleberhomogenats nach in vivo Verabreichung oder nach in vitro Zusatz von DBI ebenfalls verringert ist (25) (26).

Starke Schwankungen wurden bei der Cholesterinbestimmung aus der Leber erhalten (Tabelle 6). Auf Grund der gewonnenen Ergebnisse kann man daher über einem Einfluß des DBI auf die Cholesterinsynthese noch keine sichere Aussage machen. Von 6 Nor-

maltauben haben 3 sehr hohe Cholesterinwerte, die anderen 3 liegen mit ihren Werten um oder sogar unter dem Durchschnittswert der DBI-Tauben.

Dagegen haben 2 von den 5 DBI-Tauben der Gruppe III ebenfalls hohe Werte. Wenn das DBI überhaupt einen Einfluß auf den Einbau von C^{14} -Acetat in das Cholesterin hat, bedarf es einer größeren Anzahl von Versuchen, um statistisch vertretbare Resultate zu erhalten.

Wenn man sämtliche Ergebnisse im Zusammenhang betrachtet, zeigt sich, daß die DBI-Tauben sowohl eine Verlangsamung der Atmung im Stoffwechselversuch als auch eine Einschränkung der Fettsynthese der Leber nach Verabreichung von DBI aufweisen und daß die Cholesterinsynthese weitgehend unbeeinflusst bleibt. Wo der überwiegende Teil des C^{14} -Acetats bei den DBI-Tauben eingebaut wird, konnte durch die vorliegenden Untersuchungen nicht ermittelt werden.

Die Tatsache, daß bei der Verabreichung von DBI eine Verringerung der Fettsynthese beobachtet wurde, steht im Einklang mit histologischen Untersuchungen von Ungar (1), Mehnert und Georgii (27) und Creutzfeldt (4), die alle keine Verfettung des Leberparenchyms nach Biguanidapplikation feststellen konnten.

Z u s a m m e n f a s s u n g .

- 1.) Die Wirkung von Phenyläthylbiguanid (DBI), einem neuen Antidiabeticum, auf den Fettstoffwechsel wurde an normal ernährten Tauben untersucht. Einem Teil der Tauben wurde DBI (10 mg und 30 mg pro Dosis) in den Kropf instilliert (= DBI-Tauben), ein Teil blieb zum Vergleich ohne DBI (= Normaltauben). Nach peroraler Gabe von 1 ml 1- C^{14} -Na-Acetat wurde das ausgeatmete $C^{14}O_2$ gemessen und der Einbau des C^{14} -Acetats in die Fette und in das Cholesterin der Leber verfolgt.
- 2.) Die $C^{14}O_2$ -Ausscheidung war unter DBI im Vergleich zur Norm verringert, erfolgte langsamer und das Maximum trat verzögert ein.
- 3.) Der Einbau von C^{14} -Acetat in die Fette der Leber erfolgte bei den Normaltauben in wesentlich stärkerem Maß als bei den DBI-Tauben. Das Verhältnis der Aktivität der acetonlöslichen zu der acetonunlöslichen Fraktion zeigte durch DBI ein geringes Überwiegen der Phosphatide.
- 4.) Der Einbau von C^{14} -Acetat in das Cholesterin der Leber zeigte keine charakteristischen Unterschiede zwischen Normal- und DBI-Tauben.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Ungar, G., Freedman, L., Shapiro, S.L.: Pharmacological Studies of a New Oral Hypoglycemic Drug.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med.95,190-192, 1957
2. Pomeranze, J., Fujiy, H., Mouratoff, G.T.: Clinical Report of a New Hypoglycemic Agent.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med.95,193-194, 1957
3. Krall, L.P., Camerini-Davalos, R.: Early Clinical Evaluation of a New Oral Non-Sulfonylurea Hypoglycemic Agent.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med.95,345-347, 1957
4. Creutzfeldt, W., Moench, A.: Vergleichende Untersuchungen mit den blutzuckersenkenden Guanidinderivaten Synthalin B und Phenyläthylbiguanid (DBI).
Endokrinologie, 36, 167-185, 1958
5. Tyberghein, J.M., Williams, R.H.: Metabolic Effects of Phenethylbiguanide, A New Hypoglycemic Compound.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med.96,29-32, 1957
6. Williams, R.H., Tyberghein, J.M., Hyde, P.H., Nielsen, R.L.:
Metabolism, 6, 311-319, 1957
7. Frank, E., Nothmann, M., Wagner, A.: Die Synthalinbehandlung des Diabetes mellitus
Dtsch.med.Wschr.49,1-12, 1926
8. Frank, E., Nothmann, M., Wagner, A.: Über synthetisch dargestellte Körper mit insulinartiger Wirkung auf den normalen und diabetischen Organismus.
Klin.Wschr.5,2100-2107, 1926
9. Creutzfeldt, W.: Diabetes und synthetische Antidiabetica.
Dtsch.med.Journal, 9, 467-471, 1958
10. Mehnert, H., Krall, L.P.: Möglichkeiten und Grenzen der Diabetestherapie mit Biguanidderivaten.
Dtsch.med.Wschr.85,577-584, 1960
11. Hornung, S.: Synthalin und Leberschädigung.
Klin.Wschr.7,69-70, 1928
12. Adler, A.: Über die Nebenwirkungen des Synthalins und ihre Beseitigung
Klin.Wschr.6,493-494, 1927

13. Bertram, F.: Zum Wirkungsmechanismus des Synthalins.
Dtsch.med.Wschr. 53, 2115-2116, 1927
14. Mehnert, H., Seitz, W.: Weitere Ergebnisse der Diabetesbehandlung mit blutzuckersenkenden Biguaniden.
Münch.med.Wschr. 47, 1849-1851, 1958
15. Rittenberg, D., Bloch, K.: The Utilization of Acetic Acid for the Synthesis of Fatty Acids
J.Biol.Chem. 160, 417-424, 1945
16. Brand, V.v., Helmreich, E.: Beziehungen der Glykolyse zum Fettstoffwechsel. Die Transportfunktion der Pyridincoenzyme im Zusammenspiel von Glykolyse, Atmung und Fettsynthese.
Biochem.Zschr. 328, 146-162, 1956
17. Brand, V.v.: Ein Beitrag zur Fettsynthese. I. Über die Synthese von Neutralfett und Phosphatiden aus Acetat bei in vivo- und in vitro Versuchen.
Biochem.Zschr. 331, 162-171, 1959
18. Kolitz, H.F.: Die Verwertung von oral zugeführten $1-C^{14}$ -Na-Acetat
Dissertation, München 1959
19. Little, H.N., Bloch, K.: Studies on the Utilization of Acetic Acid for the Biological Synthesis of Cholesterol
J.Biol.Chem. 183, 33-46, 1950
20. Henning, U.: Die Biosynthese des Cholesterins.
Dtsch.med.Wschr. 84, 760-764, 1959
21. Calvin, M., Heidelberger, C., Reid, J.C., Tolbert, B.M., Yankwich, P.E.
Isotopic Carbon; J.Wiley & S., New York, 1949
22. Frantz, I.D., Schneider, H.S., Hinkelman, B.T.:
Suppression of Hepatic Cholesterol Synthesis in the Rat by Cholesterol Feeding.
J.Biol.Chem. 206, 465-469, 1954
23. Steiner, D.F., Williams, R.H.: Respiratory Inhibition and Hypoglycemia by Biguanides and Decamethylenediguanidine.
Biochem.et Biophys.Acta, 30, 329-340, 1958
24. Tyberghein, J.M., Williams, R.H.
Vortrag Endocr.Soc. New York, N.Y. 1.6.1957

25. Brand, V.v., persönl. Mitteilung
26. Mehnert, H.: Über Wirkungsweise und Indikationsbereich oraler Antidiabetika.
Dtsch.med.Wschr. 30, 1273-1279, 1958
27. Mehnert, H., Georgii, A.: Untersuchungen zur Frage einer kombinierten oralen Diabetestherapie.
Verhandlungen d.Dtsch.Ges.f.innere Med. 65. Kongress 1959.

Herrn Professor Dr.W.Seitz danke ich vielmals, daß er es mir ermöglichte, die vorliegende Arbeit im Isotopenlabor der Medizinischen Universitäts-Poliklinik auszuführen.

Besonderen Dank sage ich Frau Dr.Dr.V.v.Brand, die mir bei der Durchführung der Versuche sowie bei allen theoretischen Fragen jederzeit mit Rat und Tat behilflich war.

Herrn Dr.H.Mehnert danke ich für die Hilfe beim Aufsuchen der Literatur.

Herrn Ch.Sund danke ich für die Cholesterinbestimmungen.

L e b e n s l a u f

Am 19. Mai 1932 wurde ich, Erhard Rupert Mahrhofer, als Sohn des praktischen Arztes Dr.med.Rupert Mahrhofer und seiner Frau Tilde in Schaffa (Mähren) geboren.

Von 1938 bis 1943 besuchte ich in Grusbach (Mähren) die Volksschule und eine Klasse Bürgerschule. 1943 bis 1944 war ich Schüler des humanistischen Gymnasiums in Znaim (Mähren), 1945/46 des Realgymnasiums in Laa/Thaya (Niederösterreich) und der Oberschule in Winnenden (Württ.). Im November 1946 trat ich in die Oberschule Schorndorf (Württ.) ein, wo ich 1953 das Reifezeugnis erhielt.

Vom Sommersemester 1953 bis Sommersemester 1955 war ich an der Universität Heidelberg immatrikuliert. Nach dem Physikum in Heidelberg (1955) studierte ich vom Wintersemester 1955 bis Sommersemester 1958 an der Universität München, wo ich das Medizinische Staatsexamen im November 1958 abschloß.

1959 war ich 3 Monate lang als Medizinalassistent an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Dachau tätig und vom Juni 1959 bis März 1960 an der Medizinischen Poliklinik der Universität München. Seit April 1960 arbeite ich in der Chirurgischen Privatklinik Bogenhausen als Medizinalassistent.

